

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3232488号

(P 3 2 3 2 4 8 8)

(45) 発行日 平成13年11月26日 (2001. 11. 26)

(24) 登録日 平成13年9月21日 (2001. 9. 21)

(51) Int. Cl.

識別記号

F I

C12P 19/10

C12P 19/10

// C08B 37/00

C08B 37/00

D

P

請求項の数 6 (全11頁)

(21) 出願番号 特願平4-265285

(22) 出願日 平成4年8月20日 (1992. 8. 20)

(65) 公開番号 特開平6-65302

(43) 公開日 平成6年3月8日 (1994. 3. 8)

審査請求日 平成11年8月19日 (1999. 8. 19)

(73) 特許権者 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 尾崎 善英

岡山県岡山市北幸田703番2号

(72) 発明者 野村 達男

岡山県岡山市妹尾3308番5号

(72) 発明者 三宅 俊雄

岡山県岡山市伊島町1丁目3番23号

審査官 木村 順子

(56) 参考文献 「発酵と工業」、36(2)、p p. 98-108、(1978)

(58) 調査した分野 (Int. Cl. <sup>7</sup>, DB名)

C12P 19/10

BIOSIS (DIALOG)

(54) 【発明の名称】 ブラン高含有物とその製造方法並びに用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ブラン産生能を有する微生物を、糖質濃度10乃至20w/v%含有する培養液を用い、培養液を間欠的または連続的に抽出しつつ、追加供給する培養液の供給速度により培養液の希釈速度を調整するか、または、培養液にブランを部分的に加水分解するアミラーゼを添加するかして、培養液の粘度を30センチポイズ未満に維持しつつ培養し、培養液中にブランを産生、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするブラン高含有物の製造方法。

【請求項2】 培養液をpH4.0以下に維持しつつ培養することを特徴とする請求項1記載のブラン高含有物の製造方法。

【請求項3】 アミラーゼが、液化型α-アミラーゼ、または、イソアミラーゼである請求項1または2記載の

2  
ブラン高含有物の製造方法。

【請求項4】 培養が連続培養である請求項1乃至3のいずれかに記載のブラン高含有物の製造方法。

【請求項5】 追加供給する培養液が、微生物を予備培養した栄養培地である請求項1乃至4のいずれかに記載のブラン高含有物の製造方法。

【請求項6】 ブラン高含有物が、平均分子量25万未満のブラン高含有物である請求項1乃至4のいずれかに記載のブラン高含有物の製造方法。

10 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ブラン高含有物とその製造方法並びに用途に関し、さらに詳細には、ブラン産生能を有する微生物を、糖質濃度10乃至20w/v%含有する培養液に粘度30センチポイズ未満に

維持しつつ培養して、得られる平均分子量25万未満のブルラン高含有物とその製造方法並びに用途に関する。

【0002】

【従来の技術】ブルランは、ブルラン産生能を有する微生物を、単糖類、オリゴ糖類などの糖類を含む栄養培地に好氣的に培養して得られる粘質グルカンであって、工業的に製造されている。

【0003】その製造方法としては、例えば、特開昭49-42894に開示されているように、始発pH5.5乃至8.0に調整、とりわけ高pHに調整することによりブルランの増収を目指す方法、特開昭52-130993に開示されているようにアミラーゼ活性阻害物質共存下で、培養液の粘度低下を防止しつつ培養してブルランの増収を目指す方法などが提案されている。しかしながら、これら方法は、ブルランの工業生産的見地から、必ずしも満足できるものでないことが判明した。

【0004】一方、ブルラン産生能を有する微生物を培養してブルランを製造する方法が下記の報告で開示されている。

(1) バルマー (Bulmer) 等、アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (Applied Microbiology and Biotechnology) 第25巻、362-365頁、1987年、

(2) (Boa) 等、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotechnology and Bioengineering)、第30巻、463-470頁、1987年、

(3) マクネイル (McNeil) 等、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotechnology and Bioengineering)、第33巻、1210-1212頁、1989年、

(4) マクネイル (McNeil) 等、エンザイム・アンド・マイクロbialテクノロジー (Enzyme and Microbial Technology)、第12巻、521-525頁、1990年。

【0005】しかしながら、これらの報告も、ブルラン産生について生物化学工学的に検討が加えられているものの、グルコース、スクロース、草炭加水分解物などの糖質の濃度が2乃至5w/v%と低く、培養液の粘度についても検討されていない。また、培養液のpHについては、ボア (Boa) 等の文献では明らかにしておらず、バルマー (Bulmer) 等の文献ではpH5.5に維持し、マクネイル (McNeil) 等の文献では、pH4.5が至適pHであると報告している。培養液1L、培養1時間当りのブルランの生産性 ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) (以下、本明細書では、単にブルラン生産性という。) については、最高でもボア (Boa) 等の文献に記載されている0.48と低い値であり、その培養の期間についても不明である。従って、これらの報告を採用

して、工業的生産に有利なブルラン高含有物を生産することは極めて困難である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】前記の様な従来方法の欠点を解消し、工業的に有利な新たな培養方法によるブルラン高含有物の製造方法とその用途の確立が望まれている。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、培養によるブルラン高含有物の製造方法、とりわけ、高濃度の糖質を含有せしめた栄養培地を用いて、その培養液の粘度とそのブルラン生産性に着目し、工業的生産に有利なブルラン高含有物とその製造方法並びに用途の確立を目指して鋭意研究を続けてきた。

【0008】その結果、従来の技術とは全く違って、ブルラン産生能を有する微生物を、糖質濃度10乃至20w/v%含有する培養液に粘度30センチボイズ未満に維持しつつ培養し、得られる平均分子量25万未満のブルラン高含有物は、培養によるブルラン生産性が高く、その培養期間も長期に亘って安定することを見出し、加えて、その工業生産が極めて有利であることを見出し、その培養による製造方法、並びに、得られるブルラン高含有物を含有せしめて、増粘剤、コーティング剤、接着剤、成形物などに、また、飲食物、化粧品、医薬品、農林水産資材、紙加工資材、鉱工業資材など多方面に、その用途を確立して本発明を完成した。

【0009】以下に、本発明を更に詳細に説明する。

【0010】本発明に用いるブルラン産生能を有する微生物、ブルランを産生し得る菌株であれば何れの菌株でも良い。例えば、オーレオバシディウム・ファーメンタンス・バル・ファーメンタンス (Aureobasidium fermentans var fermentans) IFO 6410、オーレオバシディウム・ファーメンタンス・バル・フスカ (Aureobasidium fermentans var fusca) IFO 6402、オーレオバシディウム・プルランス (Aureobasidium pullulans) IFO 6353、または、オーレオバシディウム・プルランス (Aureobasidium pullulans) IFO 4464などオーレオバシディウム属に属する微生物、または、それらの突然変異株などが適宜用いられる。

【0011】栄養培地としては、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機物質などを適宜含有したものが使用される。炭素源としては、通常、例えばグルコース、マルトース、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、水飴、スクロース、フラクトース、糖化転化糖、異性化糖、糖蜜などから選ばれる1種または2種以上の糖質が、濃度10乃至20w/v%、より望ましくは10乃至18w/v%の範囲で用いられる。窒素源としては、アンモニウ

ム塩、硝酸塩などの無機窒素源またはグルタミン酸塩、ペプトン、酵母エキス、コーンステイーブリカーなどの有機窒素源などから選ばれる1種または2種以上が用いられる。他に無機物質として燐酸塩、マグネシウム塩、鉄塩などが適宜用いられる。

【0012】培養は、粘度30センチボイズ未満に維持しつつ好氣的に行う。好ましくは、pH4.0以下、より好ましくは、pH2.0を越え4.0以下で、温度約25乃至30℃の範囲から選ばれる条件で連続的に培養される。

【0013】本発明の方法において、培養中、培養液の粘度を30センチボイズ未満に維持するには、例えば、間歇的または連続的に培養液を抽出しつつ追加供給する栄養培地の供給速度により培養液の希釈速度、通常、約0.01乃至0.1h<sup>-1</sup>の範囲に調整するか、または、ブルランを部分的に加水分解して培養液の粘度低下を起こすアミラーゼ、例えば、液化型α-アミラーゼ、イソアミラーゼ等の澱粉質を部分的に加水分解する酵素を適量添加するかして行なわれる。さらに必要ならば、栄養培地として、予備培養したものを用いることも有利に実施できる。

【0014】この様にして得られたブルラン高含有培養液は、常法に従って、除菌、濃縮して、必要に応じて脱色、脱塩し、溶液状のブルラン高含有物、または、これをさらに粉末化して、粉末状のブルラン高含有物を採取する。この様にして得られたブルラン高含有物は、ブルランを、固形物当り、約50w/w%以上望ましくは、約55乃至90w/w%の範囲で含有し、その平均分子量は、通常、30万未満、望ましくは約4乃至25万の範囲である。更に必要ならば、分子量分画、有機溶媒沈澱分離などによって、より高純度のブルラン高含有物にすることも随意である。

【0015】本発明のブルラン高含有物の特性は、水溶性、増粘性、造膜性、光沢性、透明性、ガスバリアー性、耐油性、耐塩性、接着性、成形性、可食性、難消化性などを有していることから、その用途としては、例えば、増粘剤、コーティング剤、接着剤、成形物などに有利に利用される。

【0016】また、例えば、ビフィズス菌増殖促進剤、ダイエタリーファイバー食品、低カロリー食品などの飲食物、例えば、練菌磨き、乳液、クリーム、パック、整髪料、シャンプー、入浴剤などの化粧品、例えば、軟膏、錠剤、カプセル剤、代用血漿などの医薬品、例えば、コーティング種子、造粒農薬、成形肥料、成形飼料などの農林水畜産資材、例えば、糊剤、サイジング剤などの紙加工資材、排水処理剤、熔接棒、鋳型などの鋳工業資材など多方面の産業分野に広範に利用できる。

【0017】これら各種用途への利用に際しては、目的に応じて、本発明のブルラン高含有物を単独で含有せしめることも、本発明のブルラン高含有物とともにグリセ

リン、ソルビトール、マルチトール、ラクチトールなどの多価アルコールを含有せしめることも有利に実施できる。

【0018】更に必要に応じて、その他の材料、例えば、ブルラン以外の多糖類、可塑剤、増量剤、賦形剤、充填剤、増粘剤、界面活性剤、発泡剤、消泡剤、pH調整剤、安定剤、難燃剤、離形剤、抗菌剤、着色剤、着香剤、栄養物、嗜好物、呈味物、薬効物質、生理活性物質などから選ばれる1種または2種以上を含有せしめることも随意である。本発明のブルラン高含有物を含有せしめるとは、その用途製品の製造が完了するまでの工程で、ブルラン高含有物を含有せしめることができればよく、その方法としては、例えば、混和、混捏、溶解、浸漬、塗布、散布、噴霧、注入などの公知の方法が適宜選ばれる。

【0019】具体的には、例えば、増粘剤の場合には、特開昭51-51543、特開昭52-41252、特開昭58-213076などで開示される方法を、コーティング剤の場合には、特開昭52-56603、特開昭53-19416、特開昭53-119741などで開示される方法を、接着剤の場合には、特開昭51-119321、特開昭53-54593、特開昭54-108828などで開示される方法を、成形物の場合には、特開昭50-116545、特開昭51-4272、特開昭51-100470などで開示される方法を、飲食物の場合には、特開昭53-79045、特開昭60-219238、特開平2-289520などで開示される方法を、化粧品の場合には、特開昭50-64441、特開昭63-28369などで開示される方法を、医薬品の場合には、特開昭53-12417、特開昭57-67602、特開昭63-122739などで開示される方法を採用すればよい。

【0020】以下、本発明の粘度を制御しつつ培養するブルラン高含有物の製造方法を実験で説明する。

【0021】

【実験1】＜ブルラン生産性に及ぼす糖質濃度と粘度制御の影響＞

【0022】

【実験1-A】＜栄養培地の供給による粘度制御＞

【0023】ジャーファーメンターに表1に示す栄養培地を入れ、常法通り、120℃、20分間加圧滅菌し、約27℃に冷却後、無菌的に植菌して、塩酸または水酸化ナトリウムの添加により、pH3.6乃至3.8に維持しつつ、通気攪拌培養した。

【0024】種培養液は、同じ組成の栄養培地に菌株オーレオパシディウム・ブルランスIFO6353を約27℃、24時間好氣的に培養したものをを用いた。

【0025】

【表1】

培 地 成 分	濃 度 (w/v%)
糖質 (酸糖化水飴、DE43)	8乃至25
ペプトン	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
NaCl	0.2
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.04
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.001

【0026】培養液の粘度の制御方法は、培養液を間歇的または連続的に抽出しつつ栄養培地を追加供給する希釈速度の調整により行った。培地の供給は、培養が定期に達してから開始した。培養液粘度の測定は、除菌後、回転式E型粘度計 (30℃) を用いて行った。ブルラン生産性の測定は、培養300乃至320時間の間に採取した培養液について、培養液1L、培養1時間当り 20 のブルラン量 (g) を測定することにより求めた。ここ  
 というブルラン量とは、7.5 v/v%メタノールに不溶

性であって、ブルランナーゼ (EC 3.2.1.41) により加水分解を受けて主にマルトトリオースを生成する高分子物質の量をいう。

【0027】対照として、栄養培地の追加供給を行わず、粘度制御しない培養を行った。

【0028】結果は表2に示した。

【0029】

【表2】

培 養		ブルラン生産性 (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )					
栄養培地供給の有無	粘 度	糖 質 濃 度 (w/v%)					
		8	10	16	18	20	25
無	制御せず (90cp以上)	0.52	0.54	0.53	0.51	0.48	0.40
有	60乃至90cp未満に制御	0.60	0.66	0.66	0.62	0.60	0.49
有	30乃至60cp未満に制御	0.71	0.78	0.78	0.78	0.77	0.56
有	30cp未満に制御	0.78	0.89	0.91	0.89	0.88	0.62

注) 表中、cpはセンチポイズ。

【0030】表2の結果から明らかなように、各種濃度の糖質を含有する培養液で、培養液を抽出しつつ、栄養培地を追加供給してその粘度を制御しつつ培養を行った場合、糖質濃度10乃至20w/v%、好ましくは10乃至18w/v%の範囲で培養液の粘度を30センチポイズ未満に維持した時に、0.88 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> 以上の高い生産性が得られることが判明した。

【0031】

【実験1-B】＜イソアミラーゼ共存による粘度制御＞ 40  
 実験1-Aの場合と同じ組成の栄養培地を用い、培養液

粘度を60乃至90センチポイズ未満に制御する様、培養液を抽出しつつ栄養培地を追加供給し、さらに、イソアミラーゼ (株式会社林原生物化学研究所販売) の添加により表3に示す各種粘度範囲に維持しつつ、pH2.6乃至3.0の範囲に維持して培養を行った。その他の条件は実験1-Aと同様に行った。

【0032】結果は表3に示した。

【0033】

【表3】

培 養		ブルラン生産性 (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )					
イソアミラーゼ共存の有無	粘 度	糖 質 濃 度 (w/v%)					
		8	10	16	18	20	25
無	60乃至90cp未満に制御	0.58	0.62	0.60	0.56	0.54	0.43
有	30乃至60cp未満に制御	0.70	0.80	0.81	0.80	0.78	0.56
有	30cp未満に制御	0.80	0.94	1.01	0.97	0.92	0.66

注) 表中、cpはセンチポイズ。

【0034】表3の結果から明らかな様に、イソアミラ 50 ーゼ添加により粘度を制御しつつ培養を行った場合、糖

質濃度10乃至20w/v%、好ましくは、10乃至18w/v%の範囲で培養液の粘度を30センチポイズ未満に維持した時に、 $0.92\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 以上の極めて高いブルラン生産性の得られることが判明した。

【0035】

【実験2】＜粘度制御された培養でのブルラン生産性及ばすpH制御の影響＞

【0036】実験1-Bで行った糖質濃度16w/v%

の栄養培地を用いて、実験1-Bと同様に、イソアミラーゼ共存下で培養液を30センチポイズ未満に維持しつつ、各種pHに維持しながら培養して、ブルラン生産性を調べた。

【0037】結果は表4に示した。

【0038】

【表4】

pH	ブルラン生産性 ( $\text{g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ )
2.2	0.92
2.5	0.94
3.0	0.98
3.5	0.95
3.8	0.93
4.0	0.92
4.5	0.84
5.0	0.81

【0039】表4の結果から明らかな様に、培養中の制御pHとしては、pH4.0以下、望ましくは、2.0を越え4.0以下において、 $0.92\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ 以上の極めて高いブルラン生産性の得られることが判明した。

【0040】以下、実施例Aでブルラン高含有物の製造例を、実施例Bでブルラン高含有物の用途例を述べる。

【0041】

【実施例A-1】＜ブルラン高含有物＞

栄養培地は、糖質として高DE水飴（株式会社林原商事販売、登録商標サンローゼ）濃度14w/v%を用いた

他は、表1と同組成の培地を用いて、オーレオバンディウム・ブルランス IFO 6353を培養した。培養液を拔出しつつ、これに栄養培地を0.01乃至0.04 $\text{ h}^{-1}$ の希釈速度で追加供給しながら粘度を30センチポイズ未満に維持して、pHを3.6乃至3.8の範囲に維持し、27℃で1ヶ月間連続培養を行った。培養開始後4日目から拔出液は、常法により除菌、脱色、濃縮、乾燥して、粉末状のブルラン高含有物を得た。

【0042】本品の分析結果は表5に示した。

【0043】

【表5】

項 目	組 成 (製品当り、w/w%)
水 分	4.6
灰 分	2.5
プルラン	60.3
残 糖	32.5
粗蛋白質	0.1
平均分子量	6.2万

【0044】本品は、増粘剤、コーティング剤、接着剤、成形物などに、また、飲食物、化粧品、医薬品、農林水産資材、紙加工資材、鉱工業資材などに有利に利用できる。

【0045】

【実施例A-2】＜プルラン高含有物＞

栄養培地は、実施例A-1と同じものを用いて、オーレオバシディウム・プルランス IFO 6353を培養した。培養液を抽出しつつ、これに栄養培地を0.01乃至0.02 h<sup>-1</sup>の希釈速度で追加供給しながら液化

型α-アミラーゼ剤〔上田化学工業株式会社販売、商品名ハイマルトシンS (Hi-Maltosin S)〕の添加により、粘度を30センチポイズ未満に維持して、pHを3.2乃至3.4に維持し、27℃で2ヶ月間連続培養を行った。抽出液は、実施例A-1と同様に処理して、粉末状のプルラン高含有物を得た。

【0046】本品の分析結果は表6に示した。

【0047】

【表6】

項 目	組 成 (製品当り、w/w%)
水 分	5.2
灰 分	3.1
プルラン	71.4
残 糖	20.2
粗蛋白質	0.1
平均分子量	4.1万

【0048】本品は、増粘剤、コーティング剤、接着剤、成形物などに、また、飲食物、化粧品、医薬品、農林水産資材、紙加工資材、鉱工業資材などに有利に利用できる。

【0049】

【実施例A-3】＜プルラン高含有物＞

栄養培地は、糖質としてマルトース高含有水飴（株式会社林原商販売、登録商標マルトラップ）を温度11、12、13、14、15、16または18 w/v%を用いた他は、表1と同組成の培地を用いて、オーレオバシディウム・プルランス IFO 4464を培養した。培

養液を抽出しつつ、これに栄養培地を0.01乃至0.02 h<sup>-1</sup>の希釈速度で追加供給しながらイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所販売）の添加により粘度を30センチポイズ未満に維持して、pHを、2.4、2.5、2.6または2.8に維持し、27℃で2ヶ月間連続培養を行った。抽出液は、実施例A-1と同様に、除菌、濃縮して、それぞれ液状のプルラン高含有物を得た。これら製品の分析結果は表7にまとめた。

【0050】

【表7】

No.	糖質濃度 w/v%	pH	プルラン含量% (固形物当り)	平均分子量 (万)
1	11	2.4	84.2	22
2	12	2.5	84.0	20
3	13	2.6	83.6	10
4	14	2.4	74.4	22
5	15	2.5	72.9	20
6	16	2.6	71.7	10
7	18	2.8	70.5	5

【0051】これら製品は、増粘剤、コーティング剤、剤、成形物などに、また、飲食物、化粧品、医薬品、農林水産資材、紙加工資材、鉱工業資材などに有利に利用できる。

【0052】

【実施例B-1】＜摺動部シール剤＞

グリセリン56重量部に、実施例A-1の方法で製造した粉末状プルラン高含有物6重量部を加え、110℃に加温しつつ攪拌混合し、均一に溶解せしめた後、グリコシルスクロース（株式会社林原商事販売、登録商標カップリングシュガー）137重量部を加え、水分の蒸発を防止しながら、脱泡、攪拌混合した。

【0053】本組成物の粘度は、約300センチポイズを示した。本組成物をガス、特に、液化ガスを推進剤とするエアゾール容器用摺動部シール剤として、45℃で6カ月、-5℃で1年間放置したが、ガスバリアー性能に異常は認められなかった。

【0054】また、本組成物は、人畜に無害、無害な配合例であるので、摺動部に圧力差を有する気体や液化ガスが接している各種家庭用品、食料品、化粧品、医薬品などを充填するエアゾール容器の摺動部シール剤として有利に利用できる。

【0055】

【実施例B-2】＜沢庵漬（新漬）＞

大根30kgを常法に従い下漬し、サッカリン10gとともに中漬し、続いて、麩1.7kg、サッカリン10g、グリシン30g、グルタミン酸ソーダ200g、複合調味料70g、ソルビトール500g、食塩360g、焼酎（35度）250ml、および、実施例A-2の方法で製造した粉末状プルラン高含有物340gからなる床で仕上げ漬けた。

【0056】この製品は、製造12日後においても粘度の低下がほとんどなく、麩は付着しており、艶、照りともに良好であった。

【0057】

【実施例B-3】＜保冷剤＞

実施例A-1の方法で製造した粉末状プルラン高含有物

16重量部をグリセリン16重量部および水68重量部に加熱溶解し、これに適量の抗菌剤を混合し、袋詰めして保冷剤を製造した。

【0058】本品を冷却したものは、保冷効果が高く、発熱時の熱さまし、青鮮物の鮮度保持などに有利に使用できる。

【0059】

【実施例B-4】＜被覆膜＞

実施例A-3、No. 4の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度1.0w/w%水溶液とし、これに産卵後10時間以内の新鮮卵を30秒間浸漬し、次いで、30℃の温度で2時間乾燥して卵殻表面上に被覆膜を形成させた。

【0060】この被覆膜を形成させた卵を、室温（15～25℃）で保存して、その可食期間を対照の無処理卵と比較した。その結果、被覆膜を形成させた卵の保存期間は約5～10倍にも延長された。

【0061】

【実施例B-5】＜抽出用包装材＞

市販の比較的網目のあらい濾紙できている紅茶用小包装体に、実施例A-3、No. 6の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度10w/w%水溶液とし、これをカレンダー法でコーティングし、60℃の熱風で乾燥した。

【0062】得られた小包装体に1回使用量ずつの紅茶（レッグ・カット・ティー）を入れ、ヒートシールして密封した。対照として、同品質の紅茶の入った市販の小包装体を用いた。相対湿度を60%、温度を30℃に保ち1ヶ月間報知した後、それに熱湯を注いでその紅茶を抽出し、得られ抽出液の優劣で包装体を比較した。

【0063】本発明のプルラン高含有物でコーティングしたものの熱湯を注ぐと、対照と同様に容易に抽出された。抽出液はどちらも透明であった。しかしながら、抽出液の香気、色、旨味のいずれの点においても、プルラン高含有物でコーティングしたものの方が優れていた。

【0064】

【実施例B-6】＜段ボール用接着糊料＞

実施例A-3、No. 5の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度3w/w%水溶液とし、この100重量部に10w/v%のカセイソーダを10重量部添加し、20分間撹拌を行って、キャリアー部とする。別に、水100重量部にコーンスターチ40重量部をスラリーとし、更に、珪砂1重量部を添加したメイン部を作成し、この中にキャリアー部を徐々に添加混合した後、5分間撹拌して糊料を得た。

【0065】この糊料は、従来の澱粉糊料に比べ粘度変化は少なく、また、両面コールゲーターを用いてB級ライナー240g/m<sup>2</sup>とセミ中芯125g/m<sup>2</sup>を貼合実験したところ、従来の澱粉糊料では120m/min以上では貼合性不良を起す傾向が見られたが、本発明の糊料使用時には160m/minでも問題なく貼合が可能であり、接着性も良好であった。

【0066】

【実施例B-7】＜固形状接着剤＞

ジメチルスルホキシド30重量部、水25重量部、エルシナン5重量部、実施例A-2の方法で製造した粉末状プルラン高含有物5重量部、および、ジベンジリデンキシリット2重量部の混合物を、温度90℃にて1時間撹拌し、溶解せしめた後、これを直径14mm、高さ50mmの円筒状の練り上げ、練り下げ可能な機構を備えた口紅式容器に注入して室温で放冷し、固形状接着剤を製造した。

【0067】本接着剤をクラフト紙に塗り付けたところ、薄く均一に塗布することができ、初期接着力も充分であった。

【0068】本接着剤は、温度変化に伴う硬度変化が比較的小さく、常に良好な塗布と接着が可能であった。

【0069】

【実施例B-8】＜フィルム＞

実施例A-3、No. 4の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度15w/w%水溶液とし、これに固形物当りカラゲナン1w/w%および蔗糖モノラウレート0.1w/w%を溶解し、この液をポリエステルフィルム上に流延して、引取速度3m/minで厚さ0.03mmのフィルムとした後、90℃の熱風で乾燥させて製品とした。

【0070】本品は、プルラン単独フィルムとは違って、水系で速溶せず、徐々に溶解、崩壊する可食性フィルムである。

【0071】したがって、オブラートなどと同様に、飲みにくい粉状医薬などの包装剤として、また、溶解、崩壊したものが粘着性を有するため、入れ歯固定用フィルムなどとしても有利に用いられる。

【0072】

【実施例B-9】＜繊維＞

実施例A-3、No. 1の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度40w/w%とし、これに固形物当り2

w/w%のアルギン酸を溶解して紡糸原液とし、これを60℃にして、直径0.3mm、長さ1mmの円筒状ノズルより圧力3kg/cm<sup>2</sup>をかけて室温の空气中にストランドを押し出し、水分を蒸散乾燥させつつ、巻取機にて巻き取った。

【0073】得られた繊維の太さは、約20μmで、この繊維は撚ることも、編むことも、織ることもできる。しかも、親水性であって、無毒であり、皮膚への刺激がないという特徴を有しているため、例えば、脱脂綿、生理綿、カーゼ、手術糸等に好適である。

【0074】また、他の繊維と混紡すれば、その吸湿性、非帯電性、染色性を活かして、肌着、その他衣料としても使用することができる。

【0075】

【実施例B-10】＜紙＞

実施例B-9の方法で製造したプルラン高含有物の繊維を5乃至10cmに切断したものと、その半量の木材パルプとの混合物を得、この混合物の約50倍量の10℃とした75v/v%メタノールに、その混合物を均一に懸濁して抄紙機にかけた。

【0076】乾燥ロールを50～80℃に調節して乾燥した後、軽くカレンダーロールを通して紙を製造した。

【0077】この紙は、表面は滑らかであるが、光沢が比較的少なく、日本紙の地合に似ている。筆記用インキの乗りは良好で、インキのにじみはなかった。

【0078】この紙は、熱水に易溶であるので、秘密文書などの特殊用途に好適である。

【0079】また、可食性であることから、医薬品の内包装材料、調味料、コーヒー、ココアなどの食品包装材料としても好適である。

【0080】

【実施例B-11】＜発泡シート＞

塩化ビニル樹脂100重量部に対して可塑剤としてジオクチルフタレート60重量部、更に、実施例A-2の方法で製造した粉末状プルラン高含有物の50w/w%水溶液を全量に対して30w/w%加え、この混合物をらい漬機にて充分練り合わせた後、アルミ板上にアプリケーションゲーターを用いて、3mmの厚さのシートをつくり、これを190℃の熱風炉により10分間熱処理したところ、発泡倍率が約5倍の均一なセルを有する発泡シートが得られた。

【0081】本品は、防音材、断熱材、梱包材、緩衝材などに好適である。また、本品を河川水に浸漬して放置したところ、1ヶ月で崩壊したが、本発明のプルラン高含有物無添加のものは12ヶ月後でもなお原形をとどめていた。

【0082】

【実施例B-12】＜ゴルフティー＞

実施例A-1の方法で製造した粉末状プルラン高含有物10重量部および酸性白土4重量部を撹拌しつつ水を噴



霧して含水率を約30w/w%とし、これを射出成形機を用いて120℃にてゴルフティーを成形し、シェラックアルコール溶液に浸漬し、風燥して製品を得た。

【0083】本品は、ショットにより、小塊に破壊され、雨水で徐々に崩壊し、生分解される。

【0084】したがって、ゴルフ場の美観を損なわず、環境も破壊しない。

【0085】

【実施例B-13】＜植木鉢＞

実施例A-1の方法で製造した粉末状ブルラン高含有物100重量部とグリセリン15重量部およびソルビトール5重量部の混合物を、射出成形機を用いて、135℃にて植木鉢を成形し、溶融ワックスに浸漬し、放冷して製品を得た。

【0086】本品は、徐崩性、生分解性であるため、移植用植木鉢として好適であり、鉢をはずすことなく移植することができるので、植え痛みがない。

【0087】

【実施例B-14】＜カプセル＞

実施例A-1の方法で製造した粉末状ブルラン高含有物40重量部、ゼラチン60重量部、グリセリン30重量部を混合し、これに水80重量部を加えて約70℃で加熱溶解し、脱気して皮膜用溶液を得、これを用いて、常法に従って、ビタミンE高含有油を内容物とした軟カプセルを製造した。

【0088】本品は、ゼラチン単独カプセルとは違って、ガスバリアー性が高く、ビタミンEを安定に保持できるのみならず、水系で速溶性の特長を有する。

【0089】

【実施例B-15】＜肥料杭＞

配合肥料(N=14%、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>=8%、K<sub>2</sub>O=12%)、実施例A-1の方法で製造した粉末状ブルラン高含有物、硫酸カルシウム、水の割合を重量でそれぞれ70、10、15、5とし、充分混合した後、押出機(L/D=20、圧縮比=1.8、ダイスの口径=30mm)で80℃に加熱して肥料杭を製造した。

【0090】本品は、肥料用容器が不要で取扱い容易であり、全層施肥に適した強度を有し、更に、配合割合を変えることにより肥料成分の溶出速度を調節できるものである。また、必要ならば、この肥料杭に植物ホルモン、農業用薬剤および土壌改良剤などの混合も容易である。

【0091】

【実施例B-16】＜タバコ成形物＞

黄色種の粉末タバコ原料50重量部に、実施例A-2の方法で製造した粉末状ブルラン高含有物の2w/w%水溶液200重量部、ラクチトール0.1重量部とを混合して、0.2mmスリットからステンレススチール製エンドレスベルト上に射出し、これを赤外線乾燥して水分13w/w%のシートタバコ65重量部を得た。

【0092】本品は、紙巻タバコの葉組としても、葉巻およびシガリロの中巻としても好適である。また、本品は、タバコの各種成分の劣化を抑えるとともに、保香性が大であり、喫煙時に異味、異臭を発生せず、香気味は良好であった。

【0093】

【実施例B-17】＜ビフィズス菌増殖促進乳酸飲料＞  
脱脂乳10、000重量部を80℃で20分間加熱殺菌した後、40℃に冷却し、これにスターター(乳酸菌)300重量部を加えて35乃至37℃で10時間発酵させた。次いで、これをホモゲナイズした後、異性化糖シラップ4、000重量部、砂糖2、000重量部、実施例A-1の方法で製造した粉末状ブルラン高含有物170重量部を混合溶解し、70℃に保って殺菌した。これを冷却した後、少量の香料を加え、ビン詰めして乳酸菌飲料タイプのビフィズス菌増殖促進乳酸飲料を得た。

【0094】本品は、ビフィズス菌増殖促進効果のみならず、食物繊維の効果も発揮でき、腸内のpHを下げ、腐敗細菌の増殖を抑え、便秘を予防できる。

【0095】

【実施例B-18】＜低カロリーパン＞

主材料の一部として、強力粉6重量部とアミロース12重量部に水を加え捏和機で混合し、これに副材料21.4重量部(マーガリン6重量部、蔗糖2.5重量部、卵6重量部、食塩0.4重量部、水6.5重量部)および発酵源5.2重量部(ドライイースト0.8重量部、蔗糖0.4重量部、水4重量部)を加え、適度の固さのドウを作り、次いで、30℃で60分間第一発酵を行い、途中ガス抜きを行った。更に、主材料の残り12重量部(強力粉3重量部および実施例A-2の方法で製造した粉末状ブルラン高含有物9重量部)を加え捏和して均一に混合し、必要量の水を加えドウの固さを調節した。冷蔵庫に60分間置き第二発酵を行った。第三発酵は、35℃で30分間行い、ガス抜きして成形した。更に、35℃で30分間第四発酵を行った後、210℃のオーブンに入れ、20分間焼いた。対照のパンは、主材料として強力粉30重量部のみを用い、また、副材料の加水を8重量部とした他は上記と同様に行った。

【0096】パンの外相は、対照の通常パンに比べ表面の色調はやや濃く、内相はす立よく均等な組織を示した。食味は、対照の通常パンとほとんど差がなく、異味臭味のないことはいうまでもなく、多少淡泊な感じがした。歯に対する付着は、ほとんど感ぜられず、歯切れよく、表皮はやや固い感じであった。

【0097】本品は、低カロリー食品としての効果のみならず、ビフィズス菌増殖促進効果、ダイエタリーファイバーとしての効果も発揮でき、美容、健康の維持増進に有利に利用できる。

【0098】

【実施例B-19】＜練菌磨＞

第二リン酸カルシウム45.0重量部、実施例A-3、No. 4の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度10w/w%水溶液としたもの30.0重量部、ポリエチレングリコール(平均分子量1,500)30.0重量部、ラウリル硫酸ナトリウム1.5重量部、グリセリン17.0重量部、ポリオキシエチレン、ソルビタン、モノラウレート0.5重量部、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド甘味料(東洋精糖株式会社製造、商品名 $\alpha$ Gスイート)0.2重量部、防腐剤0.05重量部を常法に従って混合し、練歯磨を製造した。

【0099】本品は、適度の甘味を有しており、子供用練歯磨として好適である。また、本品は、プルラン、ポリエチレングリコール会合物を含有していることから、プルラン単独使用の場合と比較して、糸洩き性、べとつき性のない使用し易い練歯磨である。

【0100】

【実施例B-20】<バック>

リノレン酸0.5重量部を、常法に従って、スクワラン1.5重量部、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油0.5重量部、L-乳酸ナトリウム5.5重量部、グリセリン4.0重量部、実施例A-3、No. 2の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度40w/w%水溶液としたもの50.0重量部、エチルアルコール10.0重量部および精製水33.0重量部に均一に混合し、バックを製造した。

【0101】本品は、色白剤として好適であり、シミ、ソバカス、日焼けなどの局所性並びにアジソニスムなどの全身性色素沈着症の治療用、予防用などの場合に有利

に利用できる。

【0102】

【実施例B-21】<シャンプー>

実施例A-3、No. 4の方法で製造した液状プルラン高含有物2.5w/w%水溶液としたもの80.0重量部に、エチルアルコール13.0重量部、グリセリン2.0重量部、香料0.3重量部、ポリオキシエチレン、ソルビタイ、モノラウレート1.5重量部を添加し、混合溶解してシャンプーを製造した。

10 【0103】本品は、使用中の指の通りが極めて良く、かつ、洗濯後の毛髪の手触りがしなやかで、非常に使用感、爽快感に優れたシャンプーであった。

【0104】

【実施例B-22】<糖衣錠>

重量150mgの素錠を芯剤とし、これに結晶マルチール40重量部、実施例A-3、No. 2の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度10w/w%水溶液としたもの20重量部、水12重量部、タルク25重量部および酸化チタン3重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約230mgになるまで糖衣し、次いで、同じ結晶マルチール65重量部、同じ10w/w%度のプルラン水溶液1.0重量部および水25重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。

【0105】本品は、糖衣掛け時の作業性が優れているだけでなく、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

【0106】

## 【実施例 B - 23】

## ＜代用血漿＞

実施例 A - 3、No. 7 の方法で製造した液状プルラン高含有物を濃度 10 w / v % 水溶液とし、これにメタノールを 40 v / v % となるように加え、生じた下層部を除去した後、得られた上層部に更にメタノールを 55 v / v % となるように加えて静置した後、下層部を分別採取した。これからメタノールを留去し、残ったプルラン水溶液に活性炭を加えて脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂にて脱塩し、更にメンブランフィルターにて濾過して得た精製プルランを濃縮、乾燥、粉碎して、 $\overline{M}_w / \overline{M}_n$  が 1.4 であり  $\overline{M}_w$  が、50,000 であるパイロゲン無含有のプルラン白色粉末を収率約 45 % で得た。このプルランを約 4 乃至 10 w / v % の水溶液にし、これに塩類、糖類などの等張化剤を加え、滅菌して注射剤を製造した。

【0107】本品は、血漿増量剤、血流改善剤などに好適である。

【0108】

【発明の効果】上記から明らかなように、本発明は、糖質濃度 10 乃至 20 w / v % にした培養液を 30 センチポイズ未満に維持しつつ培養することにより、より高いプルラン生産性の得られることを見出し、工業的生産 30 に有利な分子量 25 万未満のプルラン高含有物とその製

造方法並びに用途を確立するものである。

【0109】本発明の培養方法により得られるプルラン高含有物の大量、安価な供給を容易にし、これを含有せしめて、増粘剤、コーティング剤、接着剤、成型物などに、また、飲食物、化粧品、医薬品、更には、農林畜産資材、紙加工資材、鋳工業資材などにその利用の道を拓くものであり、その工業的意義は大きい。

\* NOTICES \*

JPQ and NC1PI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

(57) [Claim(s)]

[Claim 1] The microorganism which has pullulan production ability, extracting culture medium intermittently or continuously using the sugar concentration 10 thru/or the culture medium which carries out 20 w/v% content [ whether the speed of supply of the culture medium which carries out additional supply adjusts the dilution rate of culture medium, and ] Or the manufacture approach of the pullulan quantity inclusion which makes it culture medium whether the amylase which hydrolyzes a pullulan partially is added, and is characterized by cultivating maintaining the viscosity of culture medium to less than 30 centipoises, making a pullulan produce and accumulate into culture medium, and extracting this.

[Claim 2] The manufacture approach of the pullulan quantity inclusion according to claim 1 characterized by cultivating maintaining culture medium to 4.0 or less pH.

[Claim 3] The manufacture approach of a pullulan quantity inclusion according to claim 1 or 2 that an amylase is liquefaction mold alpha-amylase or isoamylase.

[Claim 4] The manufacture approach of a pullulan quantity inclusion according to claim 1 to 3 that culture is continuous culture.

[Claim 5] The manufacture approach of a pullulan quantity inclusion according to claim 1 to 4 that the culture medium which carries out additional supply is the nutrition culture medium which carried out preliminary culture of the microorganism.

[Claim 6] The manufacture approach of a pullulan quantity inclusion according to claim 1 to 4 that a pullulan quantity inclusion is a with an average molecular weight of less than 250,000 pullulan quantity inclusion.

---

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**